



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA

**TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS ISOLADOS DE PLANTAS  
COM POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA SOBRE  
LINFÓCITOS B**

Kamille Duarte Uggioni

FLORIANÓPOLIS  
2012



Kamille Duarte Uggioni

**TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS ISOLADOS DE PLANTAS  
COM POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA SOBRE  
LINFÓCITOS B**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito  
obrigatório para a obtenção do Grau de  
Bacharelado e Licenciatura.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti

Coorientador: Douglas Bardini Silveira

Florianópolis  
2012



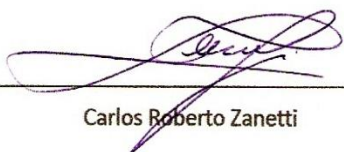
Kamille Duarte Uggioni

**TRIAGEM *IN VITRO* DE COMPOSTOS ISOLADOS DE PLANTAS  
COM POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA SOBRE  
LINFÓCITOS B**


Este trabalho foi julgado adequado para obtenção do Título de “Graduado”, e aprovado em sua forma final pelo Programa de Graduação em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 3 de agosto de 2012.

**Banca Examinadora:**



Carlos Roberto Zanetti



Caroline Rigotto Borges



Paula Fernandes dos Santos



Mariana Borsa

## **AGRADECIMENTOS**

A vida se trata, para mim, de um longo caminho a ser percorrido, não sendo importante o tempo que levarei para percorrê-lo, mas sim quem percorrerá esse caminho ao meu lado.

Primeiramente agradeço a Deus por ter me proporcionado a vida, força, coragem, paciência e um caminho ramificado para minha livre escolha que, nesse momento, me trouxe à finalização de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais Izabel e Natalino por todos os anos de dedicação, por me apoiarem em todos os momentos, sanarem minhas dúvidas, pelos conselhos em momentos de indecisão, pela educação, o amor, o apoio e a torcida em cada passo que eu dei e, principalmente, por não medirem esforços para me proporcionar, sempre, o melhor possível.

Ao meu irmão Douglas por vivenciar comigo momentos de risadas, palhaçadas, conversas, carinho, até mesmo por vir me atrapalhar em momentos de concentração, me obrigando a fazer uma pausa para espalhar.

Ao meu namorado Yuri pelo carinho, compreensão, companheirismo, amizade e amor dedicados a mim, por me oferecer sempre seus braços para o conforto de um abraço, por me fazer sorrir sempre, por me apoiar e me aconselhar quando foi preciso, por ir comigo ao laboratório nos fins de semana ou feriados e por me fazer feliz em todos os momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos de longa data, da Bio e do lab, por todos os momentos de festas, bares, jogatinas, churrascos, praias, baladas, paintball, estudos, conversas, trabalhos, risadas, parcerias, PPCCs (especialmente para os amigos da Bio), enfim, por fazerem parte de ótimos momentos da minha vida.

A professora Cláudia Maria de Oliveira Simões por ter cedido os compostos utilizados no presente trabalho.

Ao meu orientador, professor Zanetti por ter me recebido no laboratório e por ter me orientado até o final do TCC, mesmo querendo deixar a área da pesquisa de lado na sua vida.

Ao meu coorientador Douglas pelo ensinamento das metodologias utilizadas e pelas correções e orientações na escrita do TCC.

E, por fim, mas não menos importante, à Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me cedido o espaço e os recursos (nem sempre em ótimas condições) para concluir minha graduação.

“Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com  
tamanha intensidade, que se petrifica, e nenhuma força jamais o  
resgata...”

(Carlos Drummond de Andrade)



## RESUMO

A etiologia de diversos distúrbios clínicos associados ao sistema imune é conferida a desordens autorreativas ou deficiências na resposta humoral dos linfócitos B. A experimentação *in vitro* tem se mostrado viável na bioprospecção de produtos naturais, considerados fonte inesgotável de compostos com potenciais atividades biológicas e farmacológicas. O presente trabalho realizou a triagem *in vitro* de compostos isolados de plantas com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B. Utilizou-se o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) para determinar a citotoxicidade de oito compostos selecionados sobre células da linhagem linfoblatoide SKW 6.4. Em consoante, foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) para a titulação de imunoglobulinas totais secretadas por células SKW 6.4 em condições normais de cultura e sob o estímulo dos compostos selecionados. Metade dos compostos mostrou atividade citotóxica sobre as células empregadas através do ensaio de MTT, enquanto a outra metade foi capaz de reduzir o brometo de tetrazólio mesmo na ausência de células viáveis. Contagens em câmara hemocitométrica, na presença do corante Azul de Tripán, determinaram a viabilidade de células SKW 6.4 quando incubadas com os compostos capazes de reduzir diretamente o MTT, confirmando a citotoxicidade dos mesmos quando em altas concentrações. A titulação de imunoglobulinas totais secretadas pelas células demonstrou perfis de citotoxicidade semelhantes aos observados nos ensaios de MTT para todos os compostos. Os resultados globais alcançados neste estudo demonstraram que todos os compostos testados possuem efeitos citotóxicos, não apresentando atividade imunomodulatória sobre a linhagem linfoblatoide utilizada. Concluiu-se, ainda, que parte dos compostos analisados é capaz de reduzir diretamente o brometo de tetrazólio, trazendo questionamentos quanto à viabilidade da utilização do ensaio de MTT para determinação de citotoxicidade e triagem de compostos naturais, embora seja uma metodologia amplamente utilizada.

**Palavras-chave:** Linfócitos B, imunomodulação, *in vitro*, polifenóis e SKW 6.4.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estágios do desenvolvimento dos linfócitos B e seus principais eventos.....	17
Figura 2.	Fórmula estrutural do ácido gálico.....	22
Figura 3.	Fórmula estrutural dos ácidos cinâmicos utilizados.....	22
Figura 4.	Fórmula estrutural do ácido rosmarínico.....	22
Figura 5.	Fórmula estrutural do ácido elágico.....	23
Figura 6.	Fórmula estrutural do ácido equinocístico.....	23
Figura 7.	Esquema de diluições em placa de 96 poços para avaliação da citotoxicidade através do ensaio colorimétrico MTT.....	30
Figura 8.	Curva de citotoxicidade para o DMSO.....	35
Figura 9.	Curva de citotoxicidade dos compostos testados.....	36
Figura 10.	Curva de secreção de imunoglobulina pelas células SKW 6.4 em condições normais de cultura e sob influência dos compostos testados.....	38 e 39
Figura 11.	Avaliação da interferência dos compostos na redução do MTT.....	41
Figura 12.	Determinação da viabilidade de células SKW 6.4.....	42 e 43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
1.1	Sistema imune	13
1.2	Linfócitos B: desenvolvimento e regulação	14
1.3	Distúrbios clínicos associados aos linfócitos B	18
1.4	Compostos naturais potencialmente imunomoduladores	19
1.5	Experimentação <i>in vitro</i> na bioprospecção de novos imunomoduladores	24
1.6	Metodologia de avaliação da atividade de linfócitos B <i>in vitro</i>	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
3.1	Linhagem celular	28
3.2	Condições de cultura celular	28
3.3	Despirogenização de vidrarias	28
3.4	Compostos	29
3.5	Diluição dos compostos	29
3.6	Determinação da citotoxicidade dos compostos	29
3.7	Avaliação de estimulação de células SKW 6.4 através da secreção de anticorpos	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	33
4.1	Avaliação da citotoxicidade através do ensaio de MTT	33
4.2	Mensuração da secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4 através do ensaio de ELISA	34
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	45
	<b>REFERÊNCIAS</b>	46



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Sistema Imune

A imunidade se refere aos mecanismos e à capacidade que um organismo tem de responder a estímulos estranhos, como microrganismos e moléculas. Havendo o reconhecimento de um antígeno, células e moléculas do sistema imune são recrutadas para a neutralização ou eliminação do agente estimulador. Dentre os mecanismos recrutados durante uma resposta imune, pode-se dividi-los didaticamente em duas vertentes: a imunidade inata e a adquirida. Embora os limites entre elas não sejam bem definidos, esta divisão pode ser determinada por fatores como o tempo de resposta (memória) e a especificidade da reação (PARKIN; COHEN, 2001).

A imunidade inata inclui todos os elementos com os quais o indivíduo nasce e que estão sempre presentes e disponíveis para protegê-lo de infecções (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002), sendo a primeira linha de defesa contra os microrganismos. Esse braço imunológico constitui-se por barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais, células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) e células NK (*natural killer*), proteínas do sangue e proteínas denominadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade natural (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Na imunidade adquirida, a imunização acontece após o primeiro contato com o agente externo, desencadeando a ativação dos linfócitos e a síntese proteica e, frente a uma exposição subsequente ao mesmo agente agressor, culmina em uma resposta imunitária mais rápida e vigorosa (PARKIN; COHEN, 2001). Esse braço da resposta imune consiste no reconhecimento antígeno-específico, sendo necessários alguns dias para que essa resposta seja detectada, exibindo alto grau de especificidade e a propriedade de memória (ANDERSEN et al., 2006).

A fim de providenciar a resposta precoce contra uma infecção, a imunidade inata libera sinais ao braço adaptativo do sistema imune identificando a natureza do antígeno, bem como define a resposta mais apropriada a ser induzida. A comunicação entre as duas subdivisões do sistema imune é realizada principalmente por meio de proteínas

produzidas por muitos tipos celulares distintos, mediadoras das reações imunes e inflamatórias. Esse grupo de proteínas é chamado de citocinas. As citocinas são produzidas por quase todas as células e têm uma grande variedade de funções. O efeito biológico depende da citocina e da célula envolvida, estando frequentemente relacionado com ativação, divisão, apoptose ou movimento celular (PARKIN; COHEN, 2001).

Além das citocinas, as duas vertentes do sistema imune relacionam-se entre si através de comunicação celular. Reconhecido um antígeno no organismo, as células apresentadoras de antígeno (*Antigen-presenting cells*, APCs) - macrófagos, células dendríticas e células B - são capazes de fagocitá-lo e processá-lo, expressando parte dele em suas membranas ligados aos receptores do complexo principal de histocompatibilidade (*Major complex of histocompatibility*, MHC), acarretando na modificação dessa estrutura e consequentemente no reconhecimento dessas células APC pelos linfócitos T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

A sinapse imunológica ativa os linfócitos T que, posteriormente, coordenarão a resposta imune através da liberação de citocinas, recrutando o braço imunológico mais eficiente para o antígeno em questão e, dependendo do caso, a produção de anticorpos pelos linfócitos B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

## **1.2 Linfócitos B: desenvolvimento e regulação**

Os linfócitos B são conhecidos pelo seu papel humoral na defesa imunológica através da produção de anticorpos; entretanto, nas últimas décadas, têm-se visto que essas células apresentam funções anticorpo-independentes, podendo atuar como células APCs, produzir citocinas e liberar exossomos (SAMITAS; LOTVALL; BOSSIOS, 2010). Desempenham, também, um papel crucial na iniciação, amplificação, ou regulação de uma variedade de doenças autoimunes (YURASOV et al., 2005; MANJARREZ-ORDUNO; QUACH; SANZ, 2009).

Antes do nascimento, as células B se desenvolvem no fígado fetal a partir de células comprometidas com essa linhagem celular, as células pró-B. Após o nascimento, essa função é realizada em parte pela medula óssea em diferentes estágios, caracterizados por marcadores

de superfície específicos para cada um deles, como CD10, CD19, entre outros (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

As células pró-B são incapazes de produzir imunoglobulinas (Ig), entretanto é nesse estágio que ocorre a primeira recombinação das regiões variável, de diversidade e de junção – VDJ – no gene. As células pró-B são distinguidas das demais, além do estágio de recombinação VDJ, através da expressão de moléculas de superfícies exclusivas da linhagem B como CD79 (PÉREZ-VERA; REYES-LEÓN; FUENTES-PARANÁ, 2011).

No estágio seguinte do desenvolvimento a célula passa a ser denominada de pré-B, caracterizando-se por ser a primeira da linhagem B a produzir polipeptídeos das imunoglobulinas, o receptor da célula pré-B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). Essa estrutura estimula a proliferação celular e induz a diferenciação das células pré-B através da regulação da continuação do rearranjo gênico (MEFFRE; CASELLAS; NUSSENZWEIG, 2000).

O próximo estágio do desenvolvimento é caracterizado pelo sucesso do rearranjo gênico, levando à formação de uma imunoglobulina do tipo IgM na superfície celular, formando uma célula B imatura (MEFFRE; CASELLAS; NUSSENZWEIG, 2000).

Após a maturação parcial na medula óssea, os linfócitos B entram na circulação e povoam os órgãos linfoides periféricos onde completam sua maturação (PÉREZ-VERA; REYES-LEÓN; FUENTES-PARANÁ, 2011).

Os principais eventos que ocorrem durante os estágios de amadurecimento dos linfócitos B são: o rearranjo e a expressão dos genes das imunoglobulinas em uma ordem precisa; a seleção e proliferação das células B em desenvolvimento e a seleção do repertório das células B maduras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007) (Figura 1).

No final do amadurecimento, as células B imaturas passam por mecanismos de tolerância (deleção clonal e anergia) antes de deixarem a medula óssea, a fim de evitar a diferenciação terminal dos linfócitos B autorreativos. Caso o linfócito passe por essas seleções, deixará a medula óssea e seguirá para o baço ou outros órgãos linfoides secundários para completar seu ciclo de vida. Entretanto, cerca de 50% dos receptores de superfície de células B (*B cell receptor*, BCR) apresentam alto grau de autorreatividade (MERREL et al., 2006).

Caso os linfócitos maduros residentes nos órgãos linfoides secundários não encontrem antígenos cognatos, morrerão em alguns meses. Entretanto, caso ocorra algum sinal ativador, os linfócitos B darão início à resposta imune humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

A ativação dos linfócitos B pode levar à proliferação, resultando na expansão do clone de células específicas para o antígeno; ou à diferenciação, resultando na geração de plasmócitos que secretam anticorpos ativamente e, também, no desenvolvimento de células B de memória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

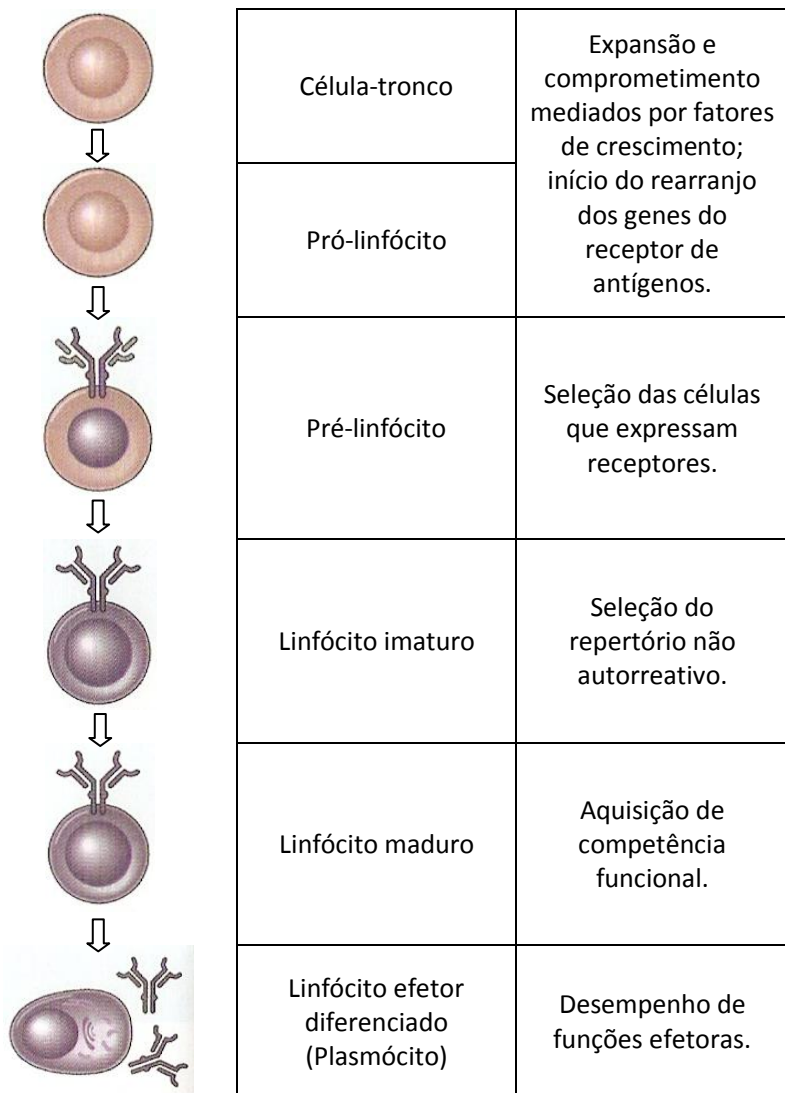
A ativação dessas células é dependente do reconhecimento antígeno-específico via BCR que, quando ativado, afeta a expressão de muitos genes essenciais no controle de várias vias, como a via da apoptose ou a via do controle e desenvolvimento celular (OLLILA; VIHINEN, 2007). Cada BCR é único, especializado para reconhecer e neutralizar um antígeno novo ou recorrente (PÉREZ-VERA; REYES-LEÓN; FUENTES-PARANÁ, 2011).

Até que haja um evento sinalizador de ativação celular, os linfócitos B maduros permanecem inativos. Essas células podem ser ativadas por antígenos com múltiplos epítomos repetitivos, capazes de causar a ligação cruzada de BCRs de células diferentes (PÉREZ-VERA; REYES-LEÓN; FUENTES-PARANÁ, 2011).

A maioria dos antígenos proteicos não são multivalentes, contendo pequenos epítomos que, sozinhos, são incapazes de realizar a ligação cruzada entre BCR's. Portanto, a resposta das células B a esses antígenos demanda sinais adicionais provenientes das células T. Essa classe de antígenos é chamada de antígenos timo-dependentes (TD). Os linfócitos T auxiliares estimulam a expansão clonal da célula B, a mudança de isótipo, a maturação da afinidade e a diferenciação em células B de memória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Alguns antígenos são capazes de ativar as células B sem a necessidade das células T ou das citocinas liberadas por elas. Essa classe de antígenos é conhecida como antígenos timo-independentes (TI) que, normalmente, são moléculas grandes e poliméricas, com múltiplos determinantes antigênicos repetitivos (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002). Nessa classe antigênica enquadram-se, por exemplo, os lipopolissacarídeos (LPS) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).





**Figura 1:** Estágios do desenvolvimento dos linfócitos B e seus principais eventos. Adaptado de Abbas, Lichtman, Pillai (2007).

Os primeiros eventos celulares resultantes da ativação de células B pela via T-independente são: a proliferação e diferenciação dos linfócitos B e a preparação para interações subsequentes com os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Há também, como consequência, um aumento na expressão de moléculas MHC II, além de receptores para citocinas derivadas das células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

### **1.3 Distúrbios clínicos associados aos linfócitos B**

A etiologia de diversos distúrbios clínicos associados ao sistema imune é conferida a desordens proliferativas, autorreatividade ou deficiências na resposta humoral de células B (OLLILA; VIHINEN, 2007; MANJARREZ-ORDUNO; QUACH; SANZ, 2009), desempenhando um papel significativo em um amplo espectro de doenças, que vão desde doenças autoimunes clássicas mediadas por essas células (BELOGUROV et al., 2009; HIKADA; ZOUALI, 2010) - como lúpus eritematoso sistêmico (BOLETIS; TSOKOS, 2005) e artrite reumatoide (MOHAN et al., 2004) - até doenças que, até recentemente, não haviam sido relacionadas com as células B, incluindo a diabetes (HU et al., 2007), esclerose múltipla (ANTEL; BAR-OR, 2006) e artrite psoriática (CAÑETE et al., 2007) ou até mesmo na rejeição de transplantes (ZACHARY; ENG, 2011).

Os linfócitos B podem atuar causando danos teciduais graves e mau funcionamento através de algumas vias, tais como a produção de anticorpos contra antígenos próprios e a formação do complexo imune (JANG; STOLLAR, 2003), podendo ser utilizados como marcadores da progressão de doenças autoimunes (BELOGUROV et al., 2009).

O papel crítico na iniciação e regulação de uma série de condições patológicas não é totalmente compreendido. No entanto, resultados emergentes apontam os linfócitos B como um dos principais alvos celulares para o estabelecimento de estratégias terapêuticas e desenvolvimento de novos fármacos imunomodulatórios (YAMAMURA; MIYAKE, 2012), aparentemente associados a poucos efeitos adversos (BLANK; SHOENFELD, 2007).

Essas constatações possibilitaram, pela primeira vez em mais de 50 anos, o licenciamento de uma nova terapia biológica visando os linfócitos B pela FDA (*US Food and Drug Administration*) e pela Agência

Europeia de Medicamentos para uso em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (RAMOS-CASALS et al., 2012).

Os medicamentos existentes atualmente baseados na terapia alvo de células B são voltados para eliminação tanto da maioria de células B (esgotamento geral), como apenas de algumas populações de células B (depleção seletiva) (SANZ; LEE, 2010). Em ambos os casos a redução é conseguida através de três mecanismos principais: 1) a morte direta por anticorpos monoclonais contra moléculas específicas de superfície (LI et al., 2008) como CD19, CD20 e CD22, alvos de atuação dos medicamentos rituximab, ocrelizumab e epratuzumab respectivamente (RAMOS-CASALS et al., 2012); 2) a segmentação do BCR, levando a apoptose das células (ZHANG et al., 1995); 3) a inativação de fatores de sobrevivência e ativação de células B como BLyS e APRIL (MIGA et al., 2000), alvos dos medicamentos belimumab e atacicept (RAMOS-CASALS et al., 2012).

Apesar da gama de medicamentos existentes atualmente para a modulação dessas células, eles apresentam efeitos secundários, geralmente não específicos, como parada cardíaca, síndrome de lise tumoral aguda, toxicidade pulmonar, podem aumentar a susceptibilidade à hepatite B e outras infecções virais (GOETZ et al., 2007) como herpes zoster (YAMAMURA; MIYAKE, 2012), não havendo terapia eficaz baseada na redução de células B para doenças autoimunes (STEPANOV et al., 2011).

Até agora, não há estudos clínicos controlados que comparem os benefícios da utilização de agentes redutores de células B isoladamente ou em combinação com outras terapias (por exemplo, corticoides, imunossupressores ou outros agentes biológicos) (RAMOS-CASALS et al., 2012).

Assim, a busca por compostos moduladores capazes de suprimir ou estimular a proliferação dos linfócitos B é justificada pela tentativa de se encontrar alternativas que busquem o equilíbrio entre a eficácia dos imunossupressores, inibindo a patogenicidade, com menos efeitos adversos da imunossupressão para os pacientes.

#### **1.4 Compostos naturais potencialmente imunomoduladores**

Os produtos naturais constituem uma fonte inesgotável de compostos com potenciais atividades biológicas e farmacológicas

devido ao grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas – especialmente no Brasil - e, conseqüentemente, à variedade de metabólitos sintetizados (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Atualmente, muitos fármacos de origem natural encontram-se disponíveis no mercado, além de serem fonte para o desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios, imunomodulatórios, antibióticos e antivirais, têm revolucionado no tratamento de diversas enfermidades.

Os efeitos imunomodulatórios modificam o comportamento biológico das células, afetando a resposta imunológica através da estimulação ou inibição do sistema imune, podendo ser produzidos endogenamente por células imunes ou de forma exógena por bactérias, fungos, algas ou plantas (LEUNG et al., 2006).

Grande parte das substâncias ativas pode ser isolada e modificada estruturalmente, alcançando maior eficácia e menor citotoxicidade (NIELSEN, 2002). Com os fármacos imunomoduladores tradicionais continuando a exibir eficácia limitada e efeitos colaterais indesejáveis, torna-se necessário o desenvolvimento de imunoterapias novas, melhores e alvo-específicas (PATWARDHAN; GAUTAM, 2005).

Nas últimas décadas, polissacarídeos de origem vegetal emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos. Atividades antitumoral, imunoestimulante, anticomplemento, anti-inflamatória, anticoagulante, antiviral, hipoglicêmica e hipocolesterolemiantes têm sido relatadas para uma grande variedade de polissacarídeos (SIMÕES, 2007).

Um grupo de substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal são os polifenóis, caracterizados pela presença de múltiplos grupos funcionais tipo fenol (TÜCKMANTEL; KOZIKOWSKI; ROMANCZYK, 1999). Essas substâncias estão presentes nas plantas como produtos do metabolismo secundário, exercendo papel importante na morfologia e fisiologia vegetal. Estão relacionados a diversas vias do crescimento e reprodução vegetal, apresentando funcionalidades como a proteção das plantas contra patógenos e predadores (BRAVO, 1998), contra estresse fotossintético e formação de espécies reativas de oxigênio (YANG et al., 2001). Com base na estrutura química desse grupo, é possível subdividi-lo em várias classes, entre elas estão os ácidos fenólicos e os taninos.

Ácidos fenólicos são compostos formados pelo anel benzênico com cadeia substituinte de um carbono. Os animais são incapazes de sintetizar esse grupo de compostos, enquanto vegetais e microrganismos são capazes de sintetizar o anel benzênico e, a partir dele, compostos fenólicos. Nas plantas usualmente ocorrem na forma de ésteres, os quais podem ser solúveis acumulando-se em vacúolos, ou insolúveis como componentes da parede celular. São encontrados em uma diversidade de plantas como no milho, cereja, pera, maçã, laranja, batata, café, entre outros (MAURICIO, 2006).

Esse grupo de compostos pode ser classificado de acordo com o esqueleto principal em três subgrupos: 1) os ácidos benzoicos que possuem sete átomos de carbono ( $C_6-C_1$ ), dentre eles o ácido gálico (Figura 2); 2) os ácidos cinâmicos que apresentam nove átomos de carbono principais ( $C_6-C_3$ ), no qual se incluem os ácidos cinâmico, cumárico, caféico e ferúlico (SIMÕES, 2007) (Figura 3); 3) compostos derivados de ácidos fenólicos como o ácido rosmarínico (Figura 4).

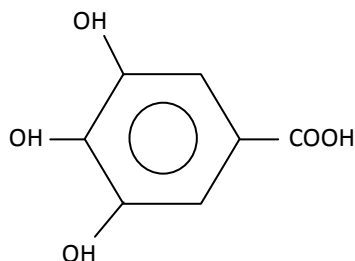
Taninos são compostos ésteres fenólicos responsáveis pela adstringência de muitos frutos, sendo facilmente oxidáveis. Esses compostos são encontrados na lentilha, vinho tinto, vinho branco, suco de maçã (MAURICIO, 2006), leguminosas e cereais (SALUNKHE et al., 1982). Nessa classe de compostos inclui-se o ácido elágico (Figura 5).

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais. Ressalta-se em ecologia química a participação de fenóis como o ácido elágico e ésteres do ácido gálico na defesa de plantas, inibição da germinação da semente e do crescimento de fungos e plantas em geral. Para alguns ácidos fenólicos como o caféico, ferúlico e seus derivados tem sido relatada a atividade antioxidante (SIMÕES, 2007).

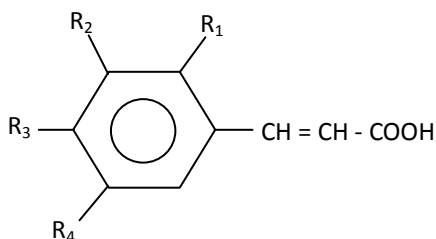
Saponinas são glicosídeos de esteróides - glicídios que, ao sofrerem hidrólise, produzem hidratos de carbono simples e outros compostos - com elevado peso molecular, caracterizados por possuírem em sua estrutura uma parte lipofílica e uma parte hidrofílica, com capacidade para formar espuma, tendo propriedades detergentes e surfactantes (GONSALVEZ et al., 1999).

Esse grupo de substâncias também tem sido alvo de interesse farmacêutico, agindo como adjuvante em formulações, componentes ativos em drogas vegetais e matéria-prima para síntese de esteroides (SIMÕES, 2007). Eles também podem inibir a produção de células

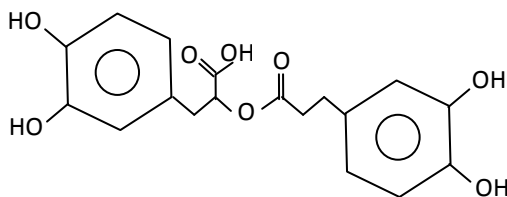
cancerígenas e aumentar a resposta imune contra elas (BRUNETON, 2001). Podem ser encontrados em plantas como a carqueja (BORELLA et al., 2006). Nessa classe de compostos se enquadra o ácido equinocístico (Figura 6) (SIMÕES, 2007).



**Figura 2:** Fórmula estrutural do ácido gálico. Adaptado de Simões (2007).



**Figura 3:** Fórmula estrutural dos ácidos cinâmicos utilizados.  $R_1=R_2=R_3=R_4=H \rightarrow$  ácido cinâmico;  $R_2=OH \rightarrow$  ácido cumárico;  $R_2=R_3=OH \rightarrow$  ácido caféico;  $R_2=OCH_3$ ;  $R_3=OH \rightarrow$  ácido ferúlico. Adaptado de Simões (2007).



**Figura 4:** Fórmula estrutural do ácido rosmarínico. Adaptado de Melo, Bruni, Ferreira (2006).



### 1.5 Experimentação *in vitro* na bioprospecção de novos imunomoduladores

Sistemas experimentais são empregados para esclarecer interações celulares da resposta imune. O sistema *in vivo* envolve modelos animais, o que muitas vezes aproxima das condições naturais reais; entretanto, a extrapolação dos resultados para espécies diferentes pode resultar em interpretações errôneas ou pouco confiáveis (GOLDSBY et al., 2008).

Além disso, os gastos com a manutenção dos animais podem ser altos, dependendo da durabilidade do estudo. Consoante as suas implicações de ordem ética e técnica, as metodologias de experimentação animal vêm sendo seriamente questionadas por organizações sociais, políticas, éticas e científicas (EUN; SUH, 2000).

Populações celulares de vertebrados são amplamente aplicadas em estudos toxicológicos (SCHIRMER, 2006), conhecidos como ensaios de toxicidade celular. Estão entre os métodos de bioensaio mais comumente utilizados para a pesquisa de toxicidade de substâncias em vários tecidos, principalmente nos danos órgão-específicos e inflamatórios (EUN; SUH, 2000).

As experimentações *in vitro* exibem muitas vantagens sobre as *in vivo* como um todo, como a disponibilidade, baixo custo e condições controladas, e permitem, conseqüentemente, a análise de várias amostras em tempo reduzido e a análise estatística consistente dos resultados (HOUGHTON, 2000). Apesar de não necessariamente refletirem situações biológicas reais (GOLDSBY et al., 2008), propiciam a redução do número de animais utilizados na pesquisa. Por estas razões, modelos *in vitro* são aceitos em experimentações de ciências da saúde humana (SCHIRMER, 2006), principalmente para a pesquisa de novos fármacos.

Vários estudos *in vitro* se mostraram viáveis para a experimentação na bioprospecção de produtos naturais atualmente, como a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial, extratos aquosos e etanoicos da camomila (PETRONILHO et al., 2012), interferência no metabolismo dos medicamentos pelo óleo essencial da camomila (GANZERA; SCHNEIDER; STUPPNER, 2006), características citotóxicas da graviola contra vários tipos de células cancerígenas, incluindo câncer pancreático (TORRES et al., 2012), entre outros.



## 1.6 Metodologia de avaliação da atividade de linfócitos B *in vitro*

A avaliação da capacidade de imunomodulação de compostos de origem natural pode ser feita através de ensaios que utilizam linhagens celulares cultiváveis *in vitro* geradas a partir de células do sistema imune humano.

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um  $\gamma$  herpesvirus envelopado de DNA dupla fita que está associado a numerosas doenças humanas, destacando-se a mononucleose infecciosa, o linfoma de Burkitt e o linfoma de Hodgkin, além de outros distúrbios linfoproliferativos (KLEIN; KLEIN; KASHUBA, 2010).

Em adição ao seu impacto clínico, o EBV é empregado em rotina laboratorial na geração de linhagens linfoblastoides cultiváveis *in vitro* a partir de linfócitos B humanos (*B-lymphoblastoid cell lines*, B-LCLs) (KLEIN; KLEIN; KASHUBA, 2010). O estabelecimento de B-LCLs em cultura tem servido para uma variedade de propósitos em estudos imunológicos, como modelos representativos de tumorigênese, latência viral em células humanas e resposta de ativação de linfócitos B pela via TI (OGHA et al., 2002).

B-LCLs são inicialmente policlonais e secretam todas as principais classes de imunoglobulina (TOSATO; COHEN, 2007), além de citocinas como interleucina (IL) 6, IL-10, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (*Tumoral necrose factor*, TNF- $\alpha$ ) e fator de necrose tumoral beta (*Tumoral necrose factor*, TNF- $\beta$ ), em combinações e quantidades variáveis, podendo variar de linhagem para linhagem.

A técnica de ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) destaca-se como uma poderosa ferramenta para detecção e quantificação de moléculas específicas. Esse ensaio é utilizado no diagnóstico de uma série de distúrbios clínicos e amplamente aplicado em pesquisa biomédica, caracterizando-se pelo curto tempo de realização, reprodutibilidade, baixo custo e utilização de pequeno volume de amostras (MIURA et al., 2008).

Recentemente, Silveira (2011) desenvolveu uma metodologia *in vitro* baseada na técnica de ELISA para a titulação de imunoglobulinas secretadas por células linfoblastoides B em condições de cultura determinadas, voltada à triagem e pesquisa de compostos com potencial atividade imunomodulatória. Essa metodologia foi utilizada no presente trabalho para realização da triagem de compostos de

origem natural com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar a triagem *in vitro* de compostos isolados de plantas com potencial atividade imunomodulatória sobre linfócitos B.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a citotoxicidade dos compostos de origem natural sobre células SKW 6.4, através do ensaio de viabilidade do MTT;
- Realizar a quantificação de imunoglobulinas secretadas por células SKW 6.4 através de teste imunoenzimático, estimuladas com diferentes concentrações das substâncias de origem natural testadas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagem Celular**

Os ensaios realizados no presente estudo utilizaram a linhagem de linfoblastoides B humanos SKW 6.4 (ATCC TIB-215), gentilmente cedida pela Dra. Maristela Martins Camargo (Laboratório de Imunorregulação Molecular, Departamento de Imunologia, ICB/USP).

#### **3.2 Condições de cultura celular**

O meio nutriente utilizado baseou-se no descrito por Ralph e colaboradores (1983) para a cultura de células SKW 6.4, com composição suplementar modificada, constituindo-se de: meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 2g/l de bicarbonato de sódio (Merck), 2,3g/l de HEPES (Biosolve), 0,11g/l de ácido pirúvico (Sigma).

Ao meio foram adicionados: 10% (V/V) de soro bovino fetal (Cultilab), 1% (V/V) de solução de 100U/mL penicillina-estreptomicina e 0.125µg/mL anfotericina B (PSA, Sigma), 1% (V/V) de solução 2mM de L-glutamina (Sigma) e 1% (V/V) de solução de aminoácidos não-essenciais (Sigma).

As células cultivadas em suspensão foram repassadas a cada três dias em alíquotas contendo aproximadamente  $5 \times 10^5$  células para 10ml de meio de cultivo e acondicionadas a temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em garrafas de cultura de 10cm<sup>3</sup> com filtro (*Techno Plastic Products*, TPP).

Para a realização dos experimentos, as células foram expandidas em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> com filtro (TPP) 48 horas antes da distribuição e acondicionamento em placas de cultura de 96 poços.

#### **3.3 Despirogenização de vidrarias**

A fim de evitar a possível ativação celular inespecífica oriunda de contaminação residual por endotoxinas e consequente artefato de técnica, toda a vidraria utilizada na cultura celular e na realização dos experimentos foi tratada por imersão em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck) 30% (V/V) durante 15 minutos, seguida de lavagem em água ultrapurificada por osmose reversa (Milli-Q) e

posterior autoclavagem convencional (121°C a 1,2 kgf·cm<sup>3</sup> durante 20 minutos), conforme metodologia inicialmente descrita por Pinto (1995) e adaptada por Celmer (2010).

### 3.4 Compostos

Os compostos de origem natural foram gentilmente fornecidos pela Profa. Dra. Cláudia Maria de Oliveira Simões (Laboratório de Virologia Aplicada, CIF/CCS/UFSC) em formulações disponíveis comercialmente e tiveram sua potencial atividade imunomodulatória testada sobre a linhagem celular acima descrita.

Os compostos selecionados têm sua distribuição, potencial atividade farmacêutica e fórmula estrutural descritos no item 1.4 do presente trabalho. Dentre os compostos testados, incluem-se polifenóis do tipo ácido fenólico - ácido gálico (Sigma, ref. G7384) (Figura 2), os ácidos cinâmico (Sigma, ref. C6004), cumárico (Sigma, ref. C9008), caféico (Sigma, ref. C0625), ferúlico (Merck, ref. 822070) (Figura 3) e o ácido rosmarínico (Extrasynthese, ref. 4957 S) (Figura 4) - e do tipo tanino - ácido elágico (Extrasynthese, ref. 6075) (Figura 5). Está incluído também um composto do grupo das saponinas, o ácido equinocístico (Extrasynthese, ref. 0033 S) (Figura 6).

### 3.5 Diluição dos compostos

Os compostos foram diluídos em solução 10% (V/V) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) em meio RPMI-540 para uma concentração final de 10mg/ml. Em seguida foram filtrados em filtro *Millipore*<sup>TM</sup> de 22µm (TPP), aliquotados e armazenados a 4°C.

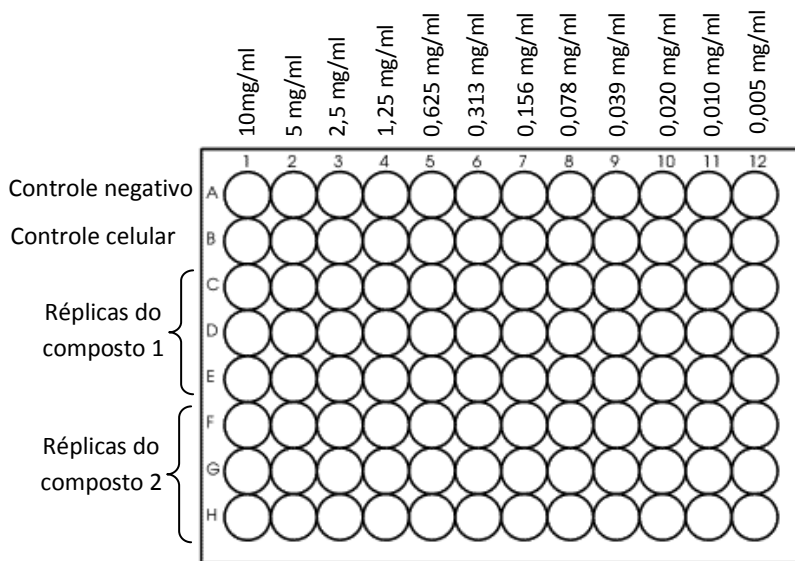
### 3.6 Determinação da citotoxicidade dos compostos

A avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada através do ensaio MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma). Essa avaliação faz-se necessária a fim de encontrar possíveis efeitos tóxicos que o composto pode ter sobre a linhagem celular utilizada no ensaio (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

O MTT é um corante amarelo na sua forma oxidada que entra nas células por endocitose (LIU; SCHUBERT, 1997) e é metabolizado, sendo

reduzido ao cristal formazana. Os cristais de formazana presentes na amostra são quantificados e, a partir da absorbância emitida por eles é possível estimar a quantidade de células viáveis, já que células mortas não são capazes de reduzir o MTT à formazana.

A avaliação foi realizada em placas de cultura de 96 cavidades (TPP), em triplicatas, como esquematizado na figura 7. Em cada cavidade foram adicionados 100µl de meio RPMI, 100µl de uma suspensão contendo aproximadamente  $1,25 \times 10^4$  células SKW 6.4/ml e 100µl do composto a ser avaliado, na concentração inicial de 10mg/ml, seguindo-se de diluições crescentes na razão 2. Uma linha da placa de cultura foi destinada para o controle negativo da reação contendo somente meio - 300 µl - e uma linha para controle celular contendo 100µl de meio e 100µl de suspensão celular. As placas foram observadas em microscópio óptico invertido para a confirmação da presença de células em todas as cavidades e, em seguida, incubadas em estufa nas condições de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C por 48 horas.



**Figura 7:** Esquema de diluições em placa de 96 poços para avaliação da citotoxicidade através do ensaio colorimétrico MTT.

Após esse período, as placas foram centrifugadas a 370xg por 5 minutos para que as células em suspensão se acumulassem no fundo da placa e não houvesse perda de amostra celular. Em seguida foram retirados 100µl do sobrenadante de cada cavidade e acondicionados em uma placa espelho, onde a localização de cada amostra é correspondente à placa original. A placa espelho foi usada, posteriormente, para a realização do ensaio de ELISA, com objetivo de mensurar os anticorpos totais secretados.

Após a retirada de 100µl de sobrenadante, foram adicionados 50µl de solução MTT diluída em meio de cultura RPMI, em uma concentração de 1mg/ml. As placas foram novamente incubadas por 4 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C.

Após a incubação, as placas foram submetidas novamente à centrifugação a 370xg por 5 minutos e, em seguida, foram retirados 100µl de solução MTT e adicionados 100 µl de DMSO em cada cavidade, inclusive nos controles negativo e celular. As placas foram, então, mantidas sob agitação durante 10 minutos para que os cristais de formazana fossem solubilizados e, em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (EL 800, Biotek) a 540nm.

### **3.7 Avaliação de estimulação de células SKW 6.4 através da secreção de anticorpos**

A mensuração da secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4, em diferentes condições experimentais, foi realizada pela técnica de ELISA previamente padronizada por Silveira (2011). Para tanto, placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços (Costar) foram primeiramente sensibilizadas com anticorpos polivalentes anti-imunoglobulinas humanas (Sigma), diluídos 1:8000 em tampão carbonato de sódio-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6), por 3 horas a 37°C.

Após a sensibilização, foi realizado o bloqueio com 200µl de tampão Tris-NaCl com 8% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé) por 1 hora a 37°C. Passado esse período, o sobrenadante foi descartado e foram feitas cinco lavagens com tampão fosfato-salino (*Phosphate buffered saline*, PBS) contendo 0,05% de Tween-20 (Nuclear) - 200 µl/poço. O mesmo procedimento de lavagem foi realizado entre os próximos passos da reação.

As placas foram, então, incubadas por 1 hora a 37°C com 100µl dos sobrenadantes da cultura contendo imunoglobulinas secretadas pelas células SKW 6.4, que foram previamente coletados na placa espelho, conforme explicado anteriormente no item 3.6. Em seguida, as placas foram lavadas e foram adicionados 100µl/poço de conjugado enzimático polivalente anti-imunoglobulinas humanas (Sigma), diluído 1:1500 em PBS contendo 0,05% (V/V) de Tween-20, e foi realizada uma nova incubação a 37°C por 1 hora.

Após lavagens, foram adicionados 100 µl/poço de solução de substrato/cromógeno – 1,2 – diaminobenzeno (OPD, Sigma) 0,4% (V/V) em tampão citrato pH 5,6 acrescido de 0,01% (V/V) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). A reação enzimática foi interrompida após 5 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com 50µl/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Nuclear). Os valores de absorbância foram determinados através de leitura a 490nm em leitor de microplacas (EL 800, Biotek).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da citotoxicidade através do ensaio MTT

A citotoxicidade de uma substância refere-se à sua capacidade de induzir a morte celular. Estudos de citotoxicidade *in vitro* têm se mostrado efetivos para a definição da toxicidade basal de um composto, como por exemplo, sua capacidade de causar danos às células, impedindo suas funções básicas e, conseqüentemente, levando-as à morte. Pode ser utilizado também para definir concentrações ideais de substâncias, refletindo na investigação de suas potenciais atividades *in vitro* (EISENBRAND et al., 2002).

No presente trabalho, utilizou-se o ensaio de MTT para a determinação de concentrações citotóxicas dos compostos sobre a linhagem celular SKW 6.4, já que esse ensaio é amplamente utilizado para mensurar viabilidade e proliferação celular (WANG et al., 2010).

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio faz parte de um grupo de compostos orgânicos heterocíclicos, se tratando de um corante amarelo na sua forma oxidada. Entra nas células por endocitose (LIU; SCHUBERT, 1997) e é metabolizado, sendo reduzido à formazana, um cristal insolúvel de coloração azul escuro (LIU; SCHUBERT, 1997). A reação é mediada por desidrogenases - enzimas associadas principalmente ao retículo endoplasmático e às mitocôndrias (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

Esses cristais são amplamente utilizados como indicadores de sistemas redox biológicos, além de indicarem a viabilidade celular com um rendimento relativamente elevado (VAN MERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011), já que células mortas não reduzem o MTT à formazana. Sendo assim, a quantidade desses cristais presentes pode ser quantificada e, a partir dela, é possível estimar a quantidade de células viáveis através da absorbância emitida (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

Para avaliar a capacidade imunomodulatória de uma substância é necessário determinar sua citotoxicidade perante a espécie celular estudada, a fim de buscar concentrações não tóxicas e potencialmente promissoras. A determinação foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.6.

Os compostos foram diluídos em 10% V/V de DMSO, conforme descrito no item 3.5. Estudos relatam que o DMSO é capaz de interagir com a membrana e o metabolismo celular, causando danos graves a célula (BRAYTON, 1986). Apesar do grau de citotoxicidade dessa substância ainda não estar completamente esclarecido, sabe-se empiricamente que DMSO pode ser usado em até 10% V/V sem causar qualquer dano celular significativo (ÖZ; AYDEMIR; FISKIN, 2012).

A fim de avaliar a citotoxicidade do DMSO sobre as células SKW 6.4, realizou-se um ensaio de MTT contendo diferentes concentrações dessa substância diluídas no meio adicionado às células, partindo de 100% - 200µl de DMSO para 100µl de suspensão celular - e chegando a 5% - 10µl de DMSO diluídos em 190µl de meio RPMI para 100µl de suspensão celular. O controle celular desse experimento consistiu em uma triplicata de poços contendo somente meio (200µl) e suspensão celular (100µl).

Uma vez estabelecido que 10% de DMSO não se tratava de uma concentração tóxica para as células testadas (Figura 8), foram feitos os testes de citotoxicidade para os compostos selecionados (Figura 9).

Inicialmente, com o ensaio de MTT, os ácidos gálico, caféico, rosmarínico e elágico se destacaram pela aparente estimulação do crescimento das células SKW 6.4, quando incubadas com altas concentrações dos compostos (Figura 9). Já os demais compostos, mostraram-se citotóxicos ou incapazes de modular o crescimento celular nas concentrações testadas (Figura 9).

## **4.2 Mensuração da secreção de imunoglobulinas por células SKW 6.4 através do ensaio de ELISA**

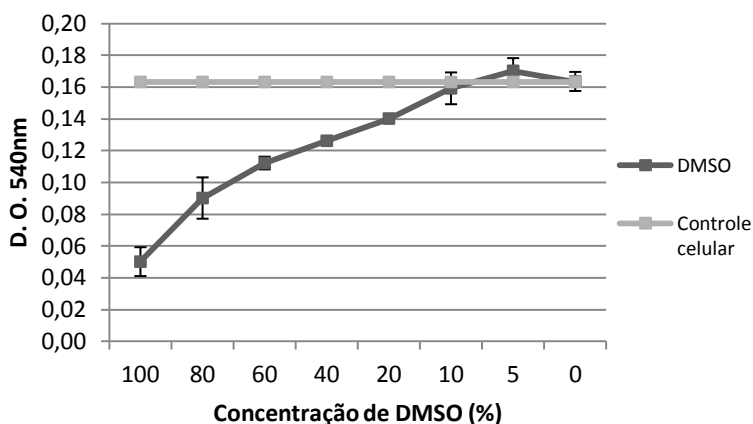
Ensaio imunoenzimáticos são amplamente utilizados em Imunologia para mensurar peptídeos, anticorpos, hormônios, metabólitos celulares, entre outras substâncias e destacam-se pela alta sensibilidade (WAN et al., 2012).

Esse método pode ser utilizado como ferramenta analítica para controle de qualidade em diversas indústrias (STERN et al., 2010), em áreas clínicas (PALTIEL et al., 2005), desenvolvimento farmacêutico (DENG et al., 2003), ciência alimentícia (REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006) e forense (LALOUP et al., 2005), no diagnóstico de doenças infecciosas e alérgicas (EL BASHIR; LAUNDY; BOOY, 2003), além de ser

descrito na literatura como o método padrão para a pesquisa e titulação de anticorpos específicos em amostras biológicas (MADRUGA; ARAUJO; SOARES, 2001).

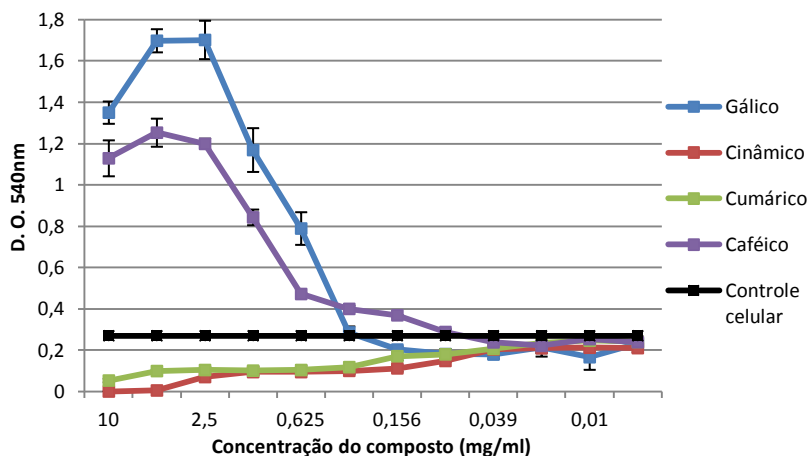
Além da sua ampla aplicabilidade, a metodologia do ELISA caracteriza-se pelo curto tempo de realização, reprodutibilidade, baixo custo e utilização de pequeno volume de amostra (MIURA et al., 2008).

Originalmente descrito por Engvall e Perlmann (1971), este ensaio pode ser subdividido em vários tipos: sanduiche, indireto e competitivo (IDEXX, 2010). Para a realização do presente trabalho utilizou-se a técnica de ELISA tipo sanduiche.

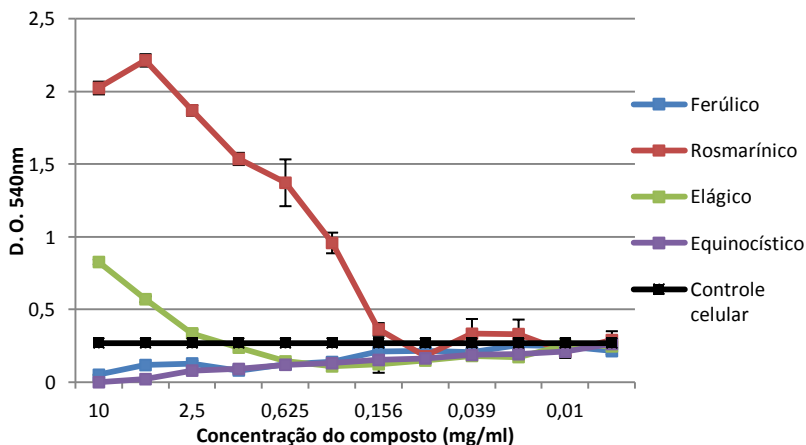


**Figura 8:** Curva de citotoxicidade para o DMSO. Células SKW 6.4 foram acondicionadas em placa de 96 poços na concentração inicial de  $1,25 \times 10^4$  células/poço e incubadas com diferentes concentrações de DMSO (eixo X) diluídas no meio adicionado às células, por 48 horas. Esse experimento teve como controle celular poços contendo somente meio RPMI e suspensão celular. O ensaio de MTT foi realizado e a quantidade de cristais formazada foi mensurada e expressa como D.O. à 540nm (eixo Y). Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondente à média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

A



B



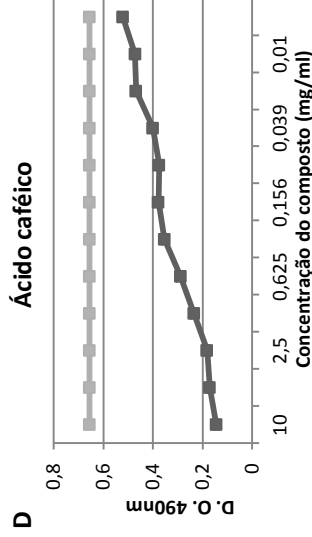
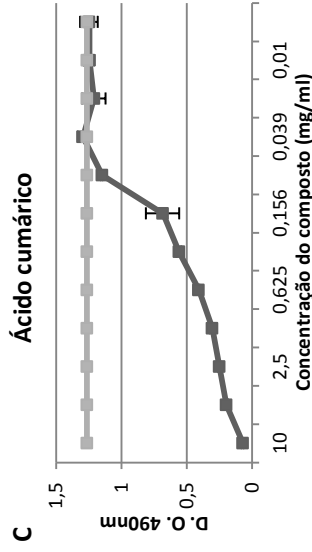
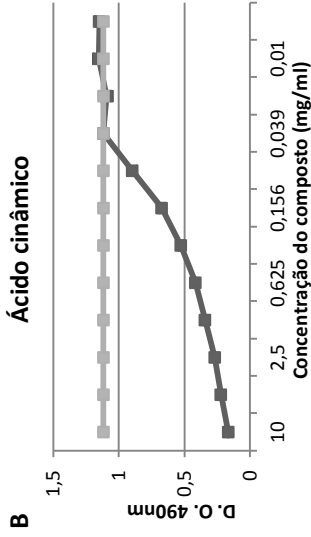
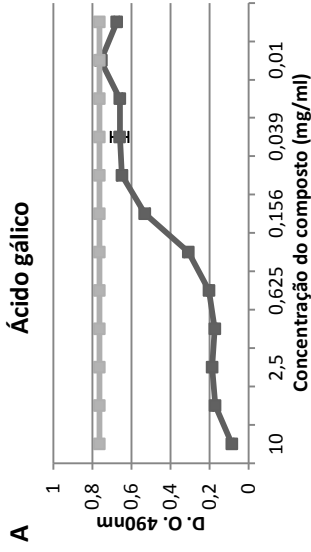
**Figura 9:** Curva de citotoxicidade dos compostos testados. Células SKW 6.4 foram acondicionadas em placa de 96 poços na concentração inicial de  $1,25 \times 10^4$  células/poço e incubadas com diferentes concentrações dos compostos (A) gálico, cinâmico, cumárico e cafêico e (B) ferúlico, rosmarínico, elágico e equinocístico (eixo X), por 48 horas, sendo o controle celular desse ensaio uma linha da placa contendo somente meio e células. O ensaio de MTT foi realizado e a leitura do espectrofotômetro é expressa como D.O. à 540nm (eixo Y). Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondente à média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

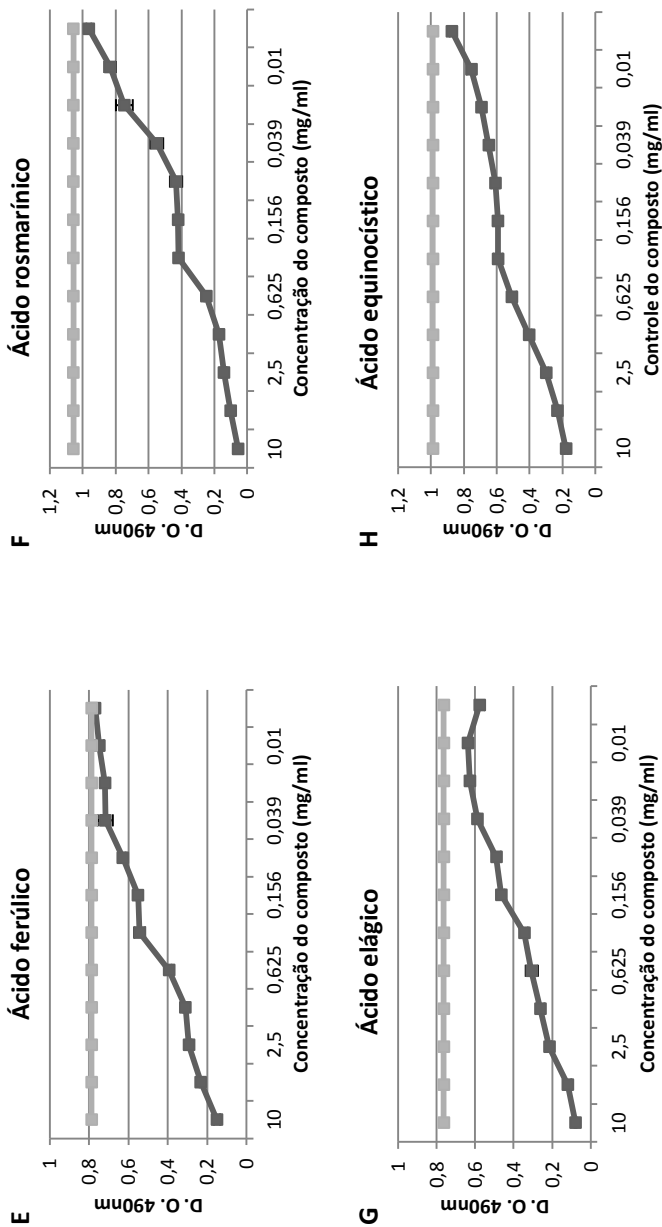
O método sanduiche consiste inicialmente na fixação, em fase sólida, do anticorpo primário específico ao antígeno de interesse, seguido da adição da solução problema contendo o antígeno. Posteriormente, o anticorpo secundário, que apresenta a mesma especificidade do anticorpo primário, conjugado a uma enzima é adicionado e, por fim, acrescenta-se o substrato cromógeno, o qual permitirá a detecção da amostra por densidade óptica (IDEXX, 2010).

Na técnica de ELISA sanduiche a cor é diretamente proporcional à quantidade do antígeno alvo presente na amostra que, no presente trabalho, consiste em anticorpos secretados pelas células SKW 6.4 em condições normais de cultura e sob a influência dos compostos testados. A mensuração foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.7. Os resultados obtidos são mostrados na figura 10.

As mensurações da secreção de imunoglobulinas sob o estímulo dos ácidos cinâmico, cumárico, ferúlico e equinocístico corroboraram os resultados obtidos no ensaio de MTT (Figura 10B, C, E e H respectivamente). Inferem-se duas hipóteses: 1) esses compostos são citotóxicos, causando a morte celular em altas concentrações e, consequentemente, resultando uma menor titulação de imunoglobulinas secretadas; 2) quando em concentrações menores, não possuem capacidade modulatória e nem são tóxicos sobre as células testadas, apresentando a mesma titulação de imunoglobulinas do controle.

Já os resultados de ELISA para os ácidos gálico, caféico, rosmarínico e elágico demonstraram perfis opostos aos obtidos no ensaio de MTT, ou seja, enquanto o estímulo celular se mostrou máximo na concentração de 10mg/ml, a secreção de imunoglobulinas foi mínima nessa mesma concentração (Figura 10A, D, F e G).





**Figura 10:** Curva de secreção de imunoglobulina pelas células SKW 6.4 em condições normais de cultura e sob influência dos compostos testados. Células SKW 6.4 foram acondicionadas em placa de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações dos ácidos (A) (A) gálico, (B) cinâmico, (C) cumárico, (D) ferúlico, (E) ferúlico, (F) rosmarínico, (G) elágico e (H) equinocístico (eixo X) por 48 horas, sendo reservada uma linha da placa contendo meio e suspensão celular para o controle celular do experimento (—), conforme descrito no item 3.7 da metodologia. Sobrenadantes foram coletados e níveis de imunoglobulinas totais mensurados através de ELISA e expressos como D.O. à 490nm (eixo Y). Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondente à média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

Inicialmente, acreditou-se que os ácidos gálico, caféico, rosmarínico e elágico eram capazes de modular a produção de imunoglobulinas sem efeitos tóxicos para as células. Durante a análise dos resultados obtidos para essas substâncias, foi levantada a possibilidade da interferência dos compostos na redução do MTT, gerando resultados falso-positivos.

Deve notar-se que o ensaio de MTT é uma medida indireta da viabilidade celular e que os materiais de ensaio podem também aumentar a redução de MTT (EUN; SUH, 2000), que pode ser influenciada por diversas condições incluindo: pH ácido (JOHNO; TAKAHASHI; KITAMURA, 2010), polifenóis (HAN et al., 2010) e oxigênio (MADESH; BALASUBRAMANIAN, 1998).

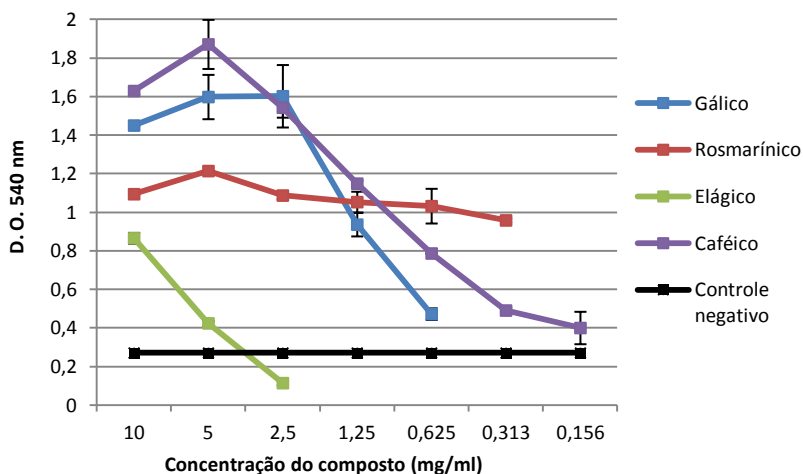
Resultados conflitantes da viabilidade e proliferação celular foram relatados para estudos de toxicidade usando o ensaio de MTT (BELYANSKAYA et al., 2007; KROLL et al., 2008; QU; ZHANG, 2010), pois esse ensaio pode superestimar a viabilidade celular ou ser incapaz de detectar uma diminuição no número de células e na sua viabilidade (WANG; YU; WICKLIFFE, 2011).

Portanto, caso as condições experimentais influenciem, os ensaios de brometo de tetrazólio usados para estimar viabilidade e proliferação celular podem não ser tão precisos e confiáveis. Sugere-se que, para os ensaios utilizados sob possíveis influências, as estimativas de viabilidade e proliferação celular sejam avaliadas com base em outros parâmetros (WANG; YU; WICKLIFFE, 2011).

Como relatado por Han e colaboradores (2010), os polifenóis podem influenciar o resultado no ensaio de MTT, pois são capazes de reduzir o brometo de tetrazólio diretamente, sem a presença de células vivas.

A fim de confirmar essa hipótese, foi realizado um ensaio de MTT semelhante aos realizados até então. No entanto, os poços continham somente compostos e meio, sem células, totalizando 200 µl. Do mesmo modo que os experimentos anteriores, uma linha da placa de cultura foi destinada para o controle negativo da reação contendo somente 200 µl de meio. Os resultados podem ser conferidos na figura 11.

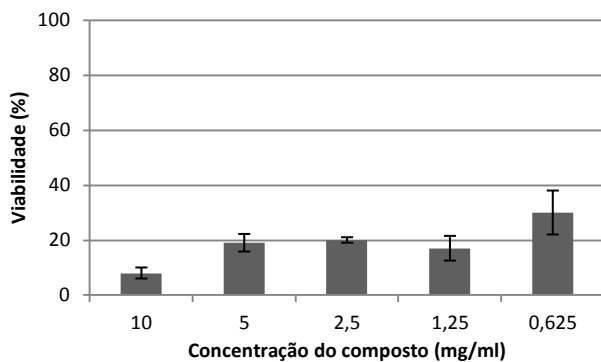
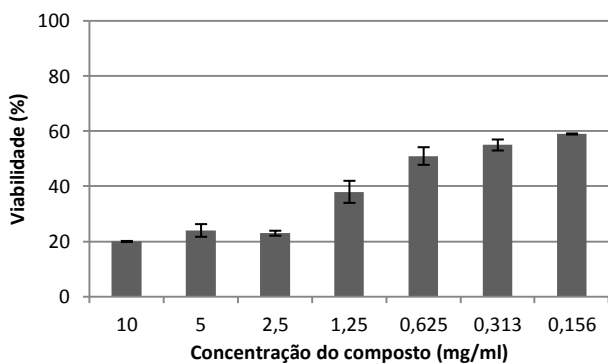
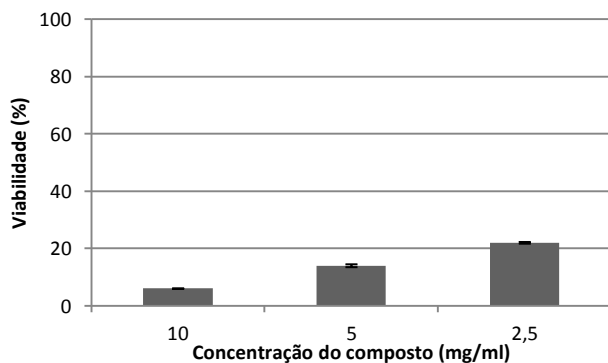


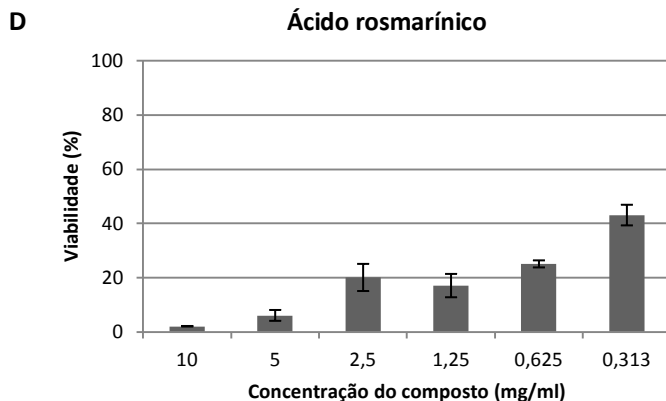


**Figura 11:** Avaliação da interferência dos compostos na redução do MTT. Amostras dos ácidos gálico, rosmarínico, elágico e caféico foram incubadas somente com meio de cultura, sem a presença de células. O controle negativo foi realizado somente com meio de cultura. Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondente à média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

É possível observar que o gráfico obtido no ensaio de MTT sem células (Figura 11) segue exatamente o mesmo padrão do resultado alcançado no ensaio com células para esses quatro compostos testados (Figura 9A e B), corroborando os resultados encontrados no estudo de Han e colaboradores (2010).

Somente com o ensaio de MTT para os ácidos gálico, caféico, rosmarínico e elágico, não foi possível estimar a viabilidade celular, já que a leitura em espectrofotômetro mostrou-se falso-positiva. Para confirmar o efeito citotóxico dessas quatro substâncias foi realizada uma contagem do número de células viáveis, com Azul de Tripán, após 48 horas de incubação com os compostos. Foram reservados seis poços da placa para o controle celular, contendo somente meio e célula. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer (L. Optik), com visualização em microscópio óptico invertido (IX51, Olympus) (Figura 12).

**A****Ácido gálico****B****Ácido caféico****C****Ácido elágico**



**Figura 12:** Determinação da viabilidade de células SKW 6.4. A viabilidade foi determinada pela contagem em câmaras hemocitométricas, na presença de corante Azul de Tripán, após 48 horas de incubação com as maiores concentrações dos compostos **(A)** gálico, **(B)** caféico, **(C)** elágico e **(D)** rosmarínico. Resultados representativos de três experimentos independentes, correspondente à média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas.

Ao avaliar-se a produção de imunoglobulinas nas concentrações falso-positivas desses compostos (Figura 10A, D, F e G), bem como os resultados obtidos da contagem celular (Figura 12), é possível inferir que, ao invés de apresentarem efeitos imunomodulatórios, essas substâncias induzem a morte das células SKW 6.4 quando incubadas com altas concentrações e, conseqüentemente, acarretam redução na produção de imunoglobulinas.

Os compostos fenólicos são reconhecidos principalmente por possuir atividade antioxidante (SIMÕES, 2007) devido a sua habilidade em “sequestrar” radicais livres (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), além de sua atuação anti-inflamatória (CHEN; TSAI; WU, 1995), potencial ação antifúngica (BARROS et al., 2013) e como agente protetor contra citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio (NAKAYAMA, 1994).

Encontra-se na literatura relatos de potenciais efeitos tóxicos dos compostos fenólicos em doses altas, podendo agir como mutagênicos, geradores de radicais livres, inibidores do metabolismo de hormônios

(SKIBOLA; SMITH, 2000), ou ainda causadores de toxicidade mitocondrial (GALATI; O'BRIEN, 2004).

No presente estudo não foi possível verificar nenhuma atividade imunomodulatória sobre células SKW 6.4. É importante salientar a atividade tóxica dos mesmos, já que todos os compostos se mostraram citotóxicos em altas concentrações para a linhagem linfoblastoide utilizada. Destaca-se que essas substâncias podem apresentar toxicidade específica para os linfócitos B, todavia seriam necessários estudos adicionais contemplando diferentes linhagens celulares a fim de confirmar essa hipótese.

Devido à importância associada aos linfócitos B no estabelecimento de estratégias terapêuticas, bem como a necessidade de desenvolver novos fármacos e a falta de estudos controlados utilizando agentes redutores de células B, faz-se necessária a continuidade de pesquisas com enfoque na modulação dessas células.

## 5. CONCLUSÕES

- O DMSO mostrou-se viável para a solubilização dos compostos quando em baixas concentrações;
- Os níveis de citotoxicidade dos compostos selecionados foram determinados sobre a linhagem SKW 6.4, partindo-se da concentração inicial de 10mg/ml, seguida de diluições crescentes na razão 2 até 0,005mg/ml. Todos os compostos se mostraram citotóxicos até a concentração 0,156mg/ml, entretanto os ácidos gálico, cinâmico, cumárico e ferúlico não são tóxicos em concentrações menores. Já os ácidos caféico, rosmarínico, elágico e equinocístico se mostraram tóxicos para a linhagem SKW 6.4 até a menor concentração testada;
- O ensaio colorimétrico de MTT mostrou-se inadequado para a avaliação da citotoxicidade de parte dos compostos utilizados nesse trabalho, uma vez que os valores obtidos na leitura de espectrofotômetro refletiram a redução do sal pelos próprios compostos e não pelas enzimas celulares;
- Nenhuma das substâncias selecionadas apresentou atividade imunomoduladora sobre as células e condições experimentais empregadas.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 566 p.

ANDERSEN, M. H.; SCHRAMA, D.; THOR STRATEN, P.; BECKER, J. C. Cytotoxic T Cells. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, p. 32-41, 2006.

ANTEL, J.; BAR-OR, A. Roles of immunoglobulins and B cells in multiple sclerosis: From pathogenesis to treatment. **Journal of Neuroimmunology**, v. 180, n. 1-2, p. 3-8, 2006.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; ALVES, C. T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C. F. R. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 41-45, 2013.

BELOGUROV, A. J.; KOZYR, A.; PONOMARENKO, N.; GABIBOV, A. Catalytic antibodies: balancing between Dr. Jekyll and Mr. Hyde. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 31, n. 11, p. 1161-1171, 2009.

BELYANSKAYA, L.; MANSER, P.; SPOHN, P.; BRUININK, A.; WICK, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. **Carbon**, v. 45, n. 13, p. 2643-2648, 2007.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 288 p.

BLANK, M.; SHOENFELD, Y. B cell targeted therapy in autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 28, n. 2-3, p. 62-68, 2007.

BORELLA, J. C.; NOVARETTI, A. A.; MENEZES, A. J.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A.; VENEZIANI, R. C.; LOPES, N. P.; Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, 317-333, 1998.

BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **The Cornell veterinarian**, v. 76, n. 1, p. 61-90, 1986.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2001, 1099 p.

CAÑETE, J. D.; SANTIAGO, B.; CANTAERT, T.; SANMARTÍ, R.; PALACIN, A.; CELIS, R.; GRAELL, E.; GIL-TORREGROSA, B.; BAETEN, D.; PABLOS, J. L. Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, p. 720-726, 2007.

CELMER, A. J. **PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA TRIAGEM IN VITRO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA EM MACRÓFAGOS**. 2010. 83 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CHEN, Y. F.; TSAI, H. Y.; WU, T. S. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. **Planta médica**, v. 61, n. 1, p. 2-8, 1995.

DENG, A.; HIMMELSBACH, M.; ZHU, Q. Z.; FREY, S.; SENGL, M.; BUCHBERGER, W.; NIESSNER, R.; KNOPP, D. Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. **Environmental science & technology**, v 37, n. 15, p. 3422-3429, 2003.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 2-3, p.193-236, 2002.

EL BASHIR, H.; LAUNDY, M.; BOOY, R. Diagnosis and treatment of bacterial meningitis. **Archives of disease in childhood**, v. 88, 615-620, 2003.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.

EUN, H. C.; SUH, D. H. Comprehensive outlook of *in vitro* tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize tests. **Journal of dermatological science**, v. 24, n. 2, p. 77-91, 2000.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free radical biology & medicine**, v. 37, p. 287-303, 2004.

GANZERA, M.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H. Inhibition effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. **Life sciences**, v. 78, p. 856-861, 2006.

GOETZ, M.; ATREYA, R.; GHALIBAFIAN, M.; GALLE, P. R.; NEURATH, M. F. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 11, p. 1365-1368, 2007.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A.; KUBY, J. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 704p.

GONSALVEZ, P. E.; LEITE, E. M.; SMITH, H.; BONTEMPO, M.; SOUZA, M. M.; PANIZZA, S.; BERNIK, V.; WALTENCIR, L.; MORAES, W. A.; HARBOR, S.; HOLLAENDER, V. P.; SANDLER, L.; CESAR, A. T. **Medicinas alternativas – Os tratamentos não convencionais**. 3. ed. São Paulo: Ibrasa, 1999. 387p.



HAN, M.; LI, J. F.; TAN, Q.; SUN, Y. Y., WANG, Y. Y. Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 195-200, 2010.

HIKADA, M.; ZOUALI, M. Multistoried roles for B lymphocytes in autoimmunity. **Nature immunology**, v. 11, p. 1065-1068, 2010.

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 6, p. 419-423, 2000.

HU, C.; RODRIGUEZ-PINTO, D.; DU, W.; AHUJA, A.; HENEGARIU, O.; WONG, F. S.; SHLOMCHIK, M. J.; WEN, L. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 12, p. 3857-3867, 2007.

IDEXX LABORATORIES. **Elisa Technical Guide 2010**. Disponível em: <[http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en\\_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf](http://www.idexx.com/pubwebresources/pdf/en_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf)> Acesso em: 25 out. 2011.

JANG, Y. J.; STOLLAR, B. D. Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 60, n. 2, p. 309-320, 2003.

JOHNO, H.; TAKAHASHI, S.; KITAMURA, M. Influences of acidic conditions on formazan assay: a cautionary note. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, p. 1529-1535, 2010.

KLEIN, G.; KLEIN, E.; KASHUBA, E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 67-73, 2010.

KROLL, A.; PILLUKAT, M. H.; HAHN, D.; SCHNEKENBURGER, J. Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 370-377, 2008.

LALOUP, M.; TILMAN, G.; MAES, V.; DE BOECK, G.; WALLEMACQ, P.; RAMAEKERS, J.; SAMYN, N. Validation of an ELISA-based screening assay for the detection of amphetamine, MDMA and MDA in blood and oral fluid. **Forensic science international**, v. 153, p. 29-37, 2005.

LEUNG, M. Y.; LIU, C.; KOON, J. C.; FUNG, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, n. 2, p. 101-114, 2006.

LI, Y.; CHEN, F.; PUTT, M.; KOO, Y. K.; MADAIO, M.; CAMBIER, J. C.; COHEN, P. L.; EISENBERG, R. A. B cell depletion with anti-CD79 mAbs ameliorates autoimmune disease in MRL/lpr mice. **Journal of immunology**, v. 181, n.5, p. 2961-2972, 2008.

LIU, Y.; SCHUBERT, D. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 6, p. 2285-2293, 1997.

MADESH, M.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. **Indian Journal of biochemistry & biophysics**, v. 35, n. 3, p. 184-188, 1998.

MADRUGA, C. R.; ARAUJO, F. R.; SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: **Imunodiagnóstico em medicina Veterinária**, EMBRAPA (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), p. 145-175, 2001.

MANJARREZ-ORDUNO, N.; QUACH, T. D.; SANZ, I. B cells and immunological tolerance. **Journal Invest Dermatology**, v. 129, n. 2, p. 278-288, 2009.

MAURICIO, A. Q. **ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO CAFÉICO E DA PIH: UM POLIFENOL NATURAL E UM QUELANTE SINTÉTICO**. 2006. 95 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MEFFRE, E.; CASELLAS, R.; NUSSENZWEIG, M. C. Antibody regulation of B cell development. **Nature immunology**, v. 1, p. 379-385, 2000.

MELO, E. B.; BRUNI, A. T.; FERREIRA, M. M. C. Inibidores da HIV-integrase: potencial abordagem farmacológica para o tratamento da AIDS. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 555-562, 2006.

MERREL, K. T.; BENSCHOP, R. J.; GAULD, S. B.; AVISZUS, K.; DECOTE-RICARDO, D.; WYSOCKI, L. J.; CAMBIER, J. C. Identification of Anergic B Cells within a Wild-Type Repertoire. **Immunity**, v. 25, n. 6, p. 953-962, 2006.

MIGA, A.; MASTERS, S.; GONZALEZ, M.; NOELLE, R. J. The role of CD40-CD154 interactions in the regulation of cell mediated immunity. **Immunological investigations**, v. 29, n. 2, p. 111-114, 2000.

MIURA, K.; ORCUTT, A. C.; MURATOYA, O. V.; MILLER, L. H.; SAUL, A.; LONG, C.A. Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. **Vaccine**, v. 26, n. 2, p. 193-200, 2008.

MOHAN, N.; EDWARDS, E. T.; CUPPS, T. R.; SLIFMAN, N.; LEE, J. H.; SIEGEL, J. N.; BRAUN, M. M. Leukocytoclastic vasculitis associated with tumor necrosis factor-alpha blocking agents. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 10, p. 1955-1958, 2004.

NAKAYAMA, T. Supression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. **Cancer research**, v. 54, p. 1991s-1993s, 1994.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 3, p. 297-305, 2002.

OGHA, S.; NOMURA, S.; TAKADA, H.; HARA, T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 203-215, 2002.

OLLILA, J.; VIHINEN, M. Immunological systems biology: gene expression analysis of B-cell development in Ramos B-cells. **Molecular immunology**, v. 44, n. 14, p. 3537-3551, 2007.

ÖZ, E. S.; AYDEMİR, E.; FISKIN, K. DMSO exhibits similar cytotoxicity effects to thalidomide in mouse breast cancer cells. **Oncology letters**, v. 3, p. 927-929, 2012.

PALTIEL, A. D.; WEINSTEIN, M. C.; KIMMEL, A. D.; SEAGE, G. R. 3<sup>rd</sup>; LOSINA, E.; ZHANG, H.; FREEDBERG, K. A.; WALENSKY, R. P. Expanded screening for HIV in the United States – an analysis of cost-effectiveness. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 6, p. 586-595, 2005.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 7, p. 495-502, 2005.

PÉREZ-VERA, P.; REYES-LEÓN, A.; FUENTES-PARANÁ, E. M. Signaling Proteins and Transcription Factors in Normal and Malignant Early B Cell Development. **Bone marrow research**, v. 2011, p. 1-10, 2011.

PETRONILHO, S.; MARASCHIN, M.; COIMBRA, M. A.; ROCHA, S. M. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Industrial crops and products**, v. 40, p. 1-12, 2012.

PINTO, T. D. J. A. Peróxido de hidrogênio como agente despirogenizante de componentes para produtos médico-hospitalares. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, p. 75-79, 1995.

QU, Q. L.; ZHANG, Y.G. Cytotoxic effects of activated carbon nanoparticles, silicon dioxide nanoparticles and titanium dioxide nanoparticles on human gastric carcinoma cell line BGC-823. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 6, p. 481-487, 2010.

RALPH, P.; SAIKI, O.; MAURER, D., H.; WELTE, K. IgM and IgG secretion in human B-cell lines regulated by B-cell-inducing factors (BIF) and phorbol ester. **Immunology Letters**, v. 7, n. 1, p. 17-23, 1983.

RAMOS-CASALS, M.; SANZ, I.; BOSCH, X.; STONE, J. H.; KHAMASHTA, M. A. B-cell-depleting therapy in systemic lupus erythematosus. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 4, p. 327-336, 2012.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G.; Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 344-353, 2006.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology & medicine**, v. 20, n. 7 p. 933-956, 1996.

SALUNKHE, D. K.; JADHAV, S. J.; KADAM, S. S.; CHAVAN, J. K. Chemical, biochemical, and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 277-305, 1982.

SAMITAS, K.; LOTVALL, J.; BOSSIOS, A. B cells: from early development to regulating allergic diseases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 58, n. 3, p. 209-225, 2010.

SANZ, I., LEE, F. E. B cells as therapeutic targets in SLE. **Nature reviews. Rheumatology**, v.6, n. 6, p. 326-337, 2010.

SCHIRMER, K. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. **Toxicology**, v. 224, n. 3, p. 163-183, 2006.

SFIKAKIS, P. P.; BOLETIS, J. N.; TSOKOS, G. C. Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 17, p. 550-557, 2005.

SILVEIRA, D. B. **PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IN VITRO PARA TRIAGEM DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA SOBRE LINFÓCITOS B**. 2011. 78 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1102p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free radical biology & medicine**, v. 39, p. 373-383, 2000.

STEPANOV, A. V.; BELOGUROV, A. A. J.; PONOMARENKO, N. A.; STREMOVSKIY, O. A.; KOZLOV, L. V.; BICHUCHER, A. M.; DMITRIEV, S. E.; SMIRNOV, I. V.; SHAMBORANT, O. G.; BALABASHIN, D. S.; SASHCHENKO, L. P.; TONEVITSKY, A. G.; FRIBOULET, A.; GABIBOV, A. G.; DEYEV, S. M. Design of Targeted B Cell Killing Agents. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. 1-10, 2011.

STERN, E.; VACIC, A.; LI, C.; ISHIKAWA, F. N.; ZHOU, C.; REED, M. A.; FAHMY, T. M. A nanoelectronic enzyme-linked immunosorbent assay for detection of proteins in physiological solutions. **Small**, v. 6, n. 2, p. 232-238, 2010.

SUDJAROEN, Y.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; WÜRTELE, G.; CHANGBUMRUNG, S.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Isolation and characterization of ellagitannins as the major polyphenolic components of Logan (*Dimocarpus logan* Lour) seeds. **Phytochemistry**, v. 77, p. 226-237, 2012.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, n. 1-2, p. 61-71, 1991.

TORRES, M. P.; RACHAGANI, S.; PUROHIT, V.; PANDEY, P.; JOSHI, S.; MOORE, E. D.; JOHANSSON, S. L.; SINGH, P. K.; GANTI, A. K.; BATRA, S.

K. Graviola: A novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* through altering cell metabolism. **Cancer letters**, v. 323, p. 29-40, 2012.

TOSATO, G.; COHEN, J. I. Generation of Epstein-Barr Virus (EBV)-immortalized B cell lines. **Current protocols in immunology**, v. 76, p. 7.22.1-7.22.4, 2007.

TÜCKMANTEL, W.; KOZIKOWSKI, A. P.; ROMANCZYK, L. J. J. Studies in Polyphenol Chemistry and Bioactivity. 1. Preparation of Building Blocks from (+)-Catechin. Procyanidin Formation. Synthesis of the Cancer Cell Growth Inhibitor, 3-O-Galloyl-(2R, 3R)-epicatechin-4 $\beta$ , 8-[3-O-galloyl-(2R, 3R)-epicatechin]. **Journal of the American Chemical Society**, n. 121, p. 12073-12081, 1999.

VAN MERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in molecular biology**, v. 731, p. 237-245, 2011.

WAN, Y.; QI, P.; ZHANG, D.; WU, J.; WANG, Y. Manganese oxide nanowire-mediated enzyme-linked immunosorbent assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 33, p. 69-74, 2012.

WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells. **Journal of microbiological methods**, v. 82, n. 3, p. 330-333, 2010.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 2147-2151, 2011.

YAMAMURA, T.; MIYAKE, S. B-cell-directed therapy: witch B cells should be targeted and how? **Immunotherapy**, v. 4, n. 5, p. 455-457, 2012.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual review of nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YURASOV, S.; WARDEMAN, H.; HAMMERSEN, J.; TSUIJI, M.; MEFFRE, E.; PASCUAL, V.; NUSSENZWEIG, M. C. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 703-711, 2005.

ZACHARY, A. A.; ENG, H. S. Desensitization: achieving immune detente. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 1, p. 3-8, 2011.

ZHANG, L.; FRENCH, R. R.; CHAN, H. T.; O'KEEFE, T. L.; CRAGG, M. S.; POWER, M. J.; GLENNIE, M. J. The development of anti-CD79 monoclonal antibodies for treatment of B-cell neoplastic disease. **Therapeutic immunology**, v. 2, n. 4, p. 191-202, 1995.

ZHANG, Y.; MA, Z.; HU, C.; WANG, L.; LI, L.; SONG, S. Cytotoxic triterpene saponins from the leaves of *Aralia elata*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 806-811, 2012.